

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

002201068

WPI Acc No: 1979-01089B/197901

Coenzyme-Q purificn. using porous synthetic resin - giving improved
sepn.

and selectivity and avoiding use of toxic solvents

Patent Assignee: NISSHIN FLOUR MILLING CO (NISS)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 53133687	A	19781121				197901 B
JP 85009796	B	19850313				198514
JP 60075294	B	19850427				198523

Priority Applications (No Type Date): JP 7745176 A 19770421; JP 8449302
A

19760204

Abstract (Basic): JP 53133687 A

The process comprises (i) treating the reduced form of coenzyme
Q

(precursor) with a porous synthetic resin, (ii) oxidising the
treated

coenzyme Q (air oxidn. or oxidn. with PbO₂), and then treating the
oxidised coenzyme Q with the porous synthetic resin.

When the porous synthetic resin is non-polar, the coenzyme Q is
eluted with a polar solvent, and when the resin is polar, the
coenzyme

Q is eluted with a non-polar solvent.

The pref. dia. of resin pore is >3 times the size of the
molecule

to be treated, usually >50 angstroms. Examples of the resins are
non-polar synthetic resins such as styrene-divinylbenzene copolymer
and

polar synthetic resins such as polyacryl esters.

The process gives improved separation and selectivity. There is
no

loss of the coenzyme during purificn., and recovery of the coenzyme
is

high. The resin may be used repeatedly.

Title Terms: COENZYME-Q; PURIFICATION; POROUS; SYNTHETIC; RESIN;
IMPROVE;

SEPARATE; SELECT; AVOID; TOXIC; SOLVENT

Derwent Class: A97; B05

International Patent Class (Additional): C12D-005/00; C12D-013/00;
C12P-007/66

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-M; A12-W11B; B04-B02C1

Plasdoc Codes (KS): 0231 2653 2705 2733 0306 1123 2020 0203 0486 0493
2000

2012

Polymer Fragment Codes (PF):

001 011 034 04- 055 056 128 231 27& 473 575 595 623 624 642 721

Chemical Fragment Codes (M1):

01 V800 G100 M531 L951 H541 H542 H721 H711 H722 H723 M240 M232 M233
 M331 M333 N050 N160 M510 M520 M540 M720 M414 M902
 Chemical Fragment Codes (M2):
 02 K0 H5 H7 M282 M210 M211 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225
 M226
 M231 M232 M240 M270 M311 M315 M316 M320 G100 M531 L951 H541 H542
 H721 H711 H722 H723 N050 N160 M510 M520 M540 M720 M414 M902
 03 G000 G001 G010 G011 G012 G013 G014 G015 G016 G017 G018 G019 G100
 H5
 H541 H542 H7 H711 H713 H714 H715 H716 H721 H722 H723 K0 L951
 M210
 M211 M215 M216 M220 M221 M222 M223 M224 M225 M226 M231 M232 M240
 M270 M282 M311 M315 M316 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M720 M903
 N050 N160
 ?

⑨日本国特許庁

⑩特許出願公開

公開特許公報

昭53-133687 A

⑪Int. Cl.²

識別記号

⑫日本分類

庁内整理番号

⑬公開 昭和53年(1978)11月21日

C 12 D 5/00

36(2) D 32

7110-49

C 12 D 13/00

1 1 2

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭補酵素Qの精製方法

⑮発明者 福島英夫

埼玉県入間郡鶴ヶ島町大字上新
田204の2

⑯特 願 昭52-45176

⑰出 願 昭52(1977)4月21日

⑱出 願 人 日清製粉株式会社

⑲発 明 者 鈴木隆夫

東京都中央区日本橋小網町19-
12

東京都練馬区旭町2-21-6

明 細 書

1. 発明の名称 補酵素Qの精製方法

2. 特許請求の範囲

- 1) 還元型補酵素Qを多孔性合成樹脂で処理し、次いで処理した還元型補酵素Qを酸化した後、さらに多孔性合成樹脂で処理することを特徴とする補酵素Qの精製法。
- 2) 多孔性合成樹脂が非極性多孔性合成樹脂である場合極性溶媒を使用してなる前記第1項記載の方法。
- 3) 多孔性合成樹脂が極性多孔性合成樹脂である場合非極性溶媒を使用してなる前記第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は多孔性合成樹脂を用いて合成、発酵あるいは天然物から得られる補酵素Qを精製するに關し、まずその前駆物質である還元型補酵素Qを多孔性合成樹脂で処理し、次いで処理した還元型補酵素Qを酸化してから再び多孔性合成樹脂で処理することを特徴とする新法を精製

方法に關する。

補酵素Qは生体内では電子伝達系に關与し、各種疾病に対して優れた薬理効果を示す物質である。精製の補酵素Qは合成、発酵あるいは天然物より得られるが、高純度の補酵素Qに精製することは、それ自体が非常に不安定な化合物である上に、各々類似した夾雑物を含むために極めて困難であつた。従来、補酵素Qの精製方法としてはシリカゲル、アルミナ、フロリクルなどの無機物を用いたクロマトグラフィーが知られている。この無機吸着剤を用いたクロマトグラフィーは類似した夾雑物を含む目的物に対しては効果の大きい精製手段ではあるが、工業的には無機吸着剤は比価が大きいためには操作に困難な点が多く、また反復使用の点でも問題がある。またポリエチレン粉末を吸着剤とする方法も知られていたが、それらは吸着率が小さく工業的精製手段とはなり得なかつた。

本発明者は商業的に実施し得る精製方法につき種々検討した結果、本発明を完成するに至

つたものである。

すなわち本発明は還元型補酵素Qを多孔性合成樹脂を用いて処理し、次いで処理した還元型補酵素Qを酸化後再び多孔性合成樹脂を用いて処理する補酵素Qの精製方法である。

本発明方法により分離精製ができる物質としては、補酵素Qの前駆物質である還元型補酵素Qおよび補酵素Qの他に、ビタミンD、およびビタミンE₂が挙げられる。

本発明方法に使用する多孔性合成樹脂としては、樹脂の単位表面積が大きいほど好適であるが、通常100m²/g以上、好しくは400m²/g以上のものである。多孔性合成樹脂の孔径は処理する化合物の分子の大きさの約3倍以上、通常50Å以上が好適であり、且つ平均孔径が大きいほど好ましい結果が得られる。

本発明に用いられる多孔性合成樹脂としては例えばスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔アンバーライトXAD-2（ローム・アンド・ハース社製）、アンバーライトXAD-4（ロー

- 3 -

ム・アンド・ハース社製）、アンバーライトXAD-7（ローム・アンド・ハース社製）、アンバーライトXAD-8（ローム・アンド・ハース社製）、アンバーライトXAD-9（ローム・アンド・ハース社製）、アミド（Amido）〔アンバーライトXAD-11（ローム・アンド・ハース社製）〕のよう

な多孔性合成樹脂が挙げられる。

本発明方法をさらに詳しく説明すると合成、洗滌および天然物から抽出したものをそのまゝあるいは必要に応じて一般的な還元剤例えば、ハイドロサルファイトソーダ、水素化銅系ナトリウム等を添加して常法により還元型補酵素Qとなしてから、前記多孔性合成樹脂を通常の溶媒によるクロマトグラフィーの担体として使用し、抽出液中の還元型補酵素Q区分を洗滌する。次に得られた還元型補酵素Qを常法の慣習を酸化剤で処理して補酵素Qにしたものを再び前記多

孔性合成樹脂によるクロマトグラフィーを行つて精製するのが一般的である。次に、得られた精製補酵素Qのうち室温以上の融点を有するものは一般的に精製手段である結晶化、例えばアセトン中で結晶化して、結晶物にすることができ。なお、本発明に係る還元型補酵素Qとしては、補酵素Qの還元物であるハイドロキノン体の外、ハイドロキノン体の水酸基がアセチル化されたハイドロキノン・モノエステル、ハイドロキノン・ジ・エステル等が挙げられる。

還元型補酵素Qが補酵素Qモノ・エステルあるいはジ・エステルの場合、補酵素Qの単なる還元物の場合と同様に多孔性合成樹脂でクロマトグラフィーを行い、次いでケン化した蒸餾化工程に行せばよい。

本発明において使用される洗出・溶出溶媒としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、アセトン、メチルエチルケトン、イソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、メチルセロソルブ、

- 5 -

メ・アンド・ハース社製）、ハイポラヌポリマーHF（三菱化成工業株式会社製）のような非極性合成樹脂、ポリアクリルエステル（アンバーライトXAD-7（ローム・アンド・ハース社製）、アンバーライトXAD-8（ローム・アンド・ハース社製）、スルホキッド〔アンバーライトXAD-9（ローム・アンド・ハース社製）〕、アミド（Amido）〔アンバーライトXAD-11（ローム・アンド・ハース社製）〕のよう

な極性合成樹脂が挙げられる。

本発明方法をさらに詳しく説明すると合成、洗滌および天然物から抽出したものをそのまゝあるいは必要に応じて一般的な還元剤例えば、ハイドロサルファイトソーダ、水素化銅系ナトリウム等を添加して常法により還元型補酵素Qとなしてから、前記多孔性合成樹脂を通常の溶媒によるクロマトグラフィーの担体として使用し、抽出液中の還元型補酵素Q区分を洗滌する。次に得られた還元型補酵素Qを常法の慣習を酸化剤で処理して補酵素Qにしたものを再び前記多

- 4 -

孔性合成樹脂によるクロマトグラフィーを行つて精製するのが一般的である。次に、得られた精製補酵素Qのうち室温以上の融点を有するものは一般的に精製手段である結晶化、例えばアセトン中で結晶化して、結晶物にすることができ。なお、本発明に係る還元型補酵素Qとしては、補酵素Qの還元物であるハイドロキノン体の外、ハイドロキノン体の水酸基がアセチル化されたハイドロキノン・モノエステル、ハイドロキノン・ジ・エステル等が挙げられる。

還元型補酵素Qが補酵素Qモノ・エステルあるいはジ・エステルの場合、補酵素Qの単なる還元物の場合と同様に多孔性合成樹脂でクロマトグラフィーを行い、次いでケン化した蒸餾化工程に行せばよい。

本発明において使用される洗出・溶出溶媒としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、n-プロパノール、アセトン、メチルエチルケトン、イソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、メチルセロソルブ、

本発明において特に好ましい方法としては還

- 6 -

元型樹脂Rおよび補綴素Rのいずれの場合でも多孔性合成樹脂として多孔性合成樹脂を用い、抽出溶媒として、アルコール類、ケトン類、ジメチルスルホキシド、 N,N -ジメチルホルムアミド、アセトニトリルなどの極性溶媒を使用して抽出する方法が好適である。この場合使用される極性溶媒としては一般には炭素数1~5のアルコール類、炭素数3~6のケトン類を基本とする混合溶媒、例えばメタノールと水、メタノールとアセトン、メタノールとエーテル、アセトンと水などの組合せが工業的に有利である。またその他の種々の組合せ、又は単一溶媒の使用が可能なることは勿論である。

本発明方法は一般に次の順序によつて実施される。

塔長徑比10以上のカラムに水を満たし、自然沈降によつて目的物の倍(容積/重量)以上の多孔性合成樹脂を充填する。次に精製目的物質が溶出しないうちに溶媒でカラムを置換したのち目的物をカラムの上端から洗脱させる。フロー

- 7 -

速度に加えて、本発明方法ではさらに還元型補綴素Rと補綴素Rの性質の差を利用し各々の化合物の溶解性において類似する構造を有する夾持物を分離することができるので高純度の補綴素Rを得ることができる。また本発明方法に使用される多孔性合成樹脂は無機吸着剤、イオン交換樹脂などとは異なり化学的に不活性であることから、溶出力の大きい溶媒例えばアセトンなどにより吸着物を洗脱させることにより容易にしかも完全に元の状態に再生されるので工業的にきわめて有利である。

本発明は従来法と比較し次のごとく著しく優れた効果を有するものである。即ち分離選択性が極めて大きいこと、また多孔性合成樹脂に対する夾持物の吸着量が極めて大きく、かつ無機吸着剤と異なり、吸着点がないため分解が起らず、多孔性合成樹脂の再操作にかける損失が全くなく、回収率が著しく高いこと、多孔性合成樹脂を繰り返し使用することができること、無機物の吸着剤と炭化水素類、エーテル類など

- 8 -

特開昭53-133627(3)

トグラフイーは一般の方法と同様に行うが、目的物の粉品が析出する場合は必要に応じてカラムを加湿してもよい。抽出液は区分して採取し目的物質を含む抽出区分を濃縮すれば目的物質が得られる。次にアセトン、ベンゼン、エーテル、エステル類などの溶出力の大きい溶媒によりカラムを洗淨し、吸着物質を除き、溶媒でカラムを置換することにより再び精製クロマトグラフイーを実施することができる。

補綴素Rのようなイソブレン骨格を有する化合物は、多孔性合成樹脂との間に適度の親和力が生じるため選択的に類似構造を有する夾持物を容易に分離することができる。補綴素R等の化合物と多孔性合成樹脂との親和力はイソブレン類にのみ由来するものではなく、分子を構成している置換基の極性、立体構造等によつても左右される。従つて、多孔性合成樹脂を使用することにより、従来の吸着剤による精製方法即ち吸着剤と分子の極性点同志による吸着、脱離の方式による精製では得られなかつた大きな選

- 9 -

別的水性溶媒を用いる従来方法と異なり、静電気等による火災の危険性の少ないより安全な所蔵の選択が可能となつたことと経済性および使用法共に満足し得るものである。

次に本発明の実施例を示すがこれらは精製法の一例であつてこれに限定されるものではない。
実施例 1

ハイパーラスポリマー HP-20 (比表面積 718.0 m^2/g 、細孔容積 1.077 ml/g 、40メッシュ、三栄化成工業株式会社製) 200 ml をガラス製カラム ($\phi 45\text{mm} \times 300\text{mm}$) に充填し、アセトン:メタノール (5:7) 混合液にて逆流洗脱精製する。これにインデカブレンオールと 2,3-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノンを三酸化カウチン・エーテル類体脂肪の存在下に縮合して得た 2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンオールハイドロキノンを(還元型補綴素 R1e) を含む油状物 30 g (純度 48%) を記号混合液 30 ml で攪拌乳濁させて充填カラム中を洗脱させる。次いで同一混合液で洗脱させ

- 10 -

る。抽出液は約100mlづつ区分し、それぞれの区分液の濃縮小量についてシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行つて2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンニルハイドロキノンを含む区分を集合させ、溶媒を減圧蒸餾によつて蒸去する。得られた処理物をイソプロピルエーテル400mlに溶解させ、5%水酸化カリウム水20mlを加え、室温で攪拌下に30分間空気を導入して酸化する。次いでイソプロピルエーテル層を水洗し、溶液を乾燥してから減圧留めすると精製系Q₁₀を含む赤色油状物が得られる。

次に先に使用したと同じハイポラスポリマーHP-20を充填したカラムをアセトンで洗浄し、アセトン洗液を除去した後、アセトン：メタノール（1：1）の混合溶剤で逆洗し、静置する。次にカラムを35℃に保温してから前記赤色油状物をアセトン20mlに乳濁させて充填カラム中を流動させる。同溶液で長分分割されたのち薄層クロマトグラフィーを行つて、精製系Q₁₀を含む区分を蒸餾し、精製系Q₁₀ 13.9g

-11-

精製系Q₉を含む赤色油状物が得られる。

次に先に使用したと同じハイポラスポリマーHP-20を充填したカラムをアセトンで洗浄し、アセトン洗液を除去した後、アセトン：メタノール（4：6）の混合溶剤で逆洗し、静置する。次に前記赤色油状物を同溶液20mlに乳濁させて充填カラム中を流動させる。同溶液で長分分割したのち精製系Q₉を含む区分を蒸餾すると精製系Q₉ 13.3g（純度97%）が得られる。さらにアセトンで再結晶し精製系Q₉ 10.9g（純度98.9%、m.p. 45℃）を得た。

実施例 3

Pseudomonas 属菌 [*Pseudomonas denitrificans*, NRRL B-1665 (Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois 61604)] を培養し、遠心分離により集菌して得た菌体ペーストを水酸化ナトリウムおよびピロガロールの存在下に、ヘキサシメタノール混合液で加熱抽出する。次にヘキサシメタノール層を5%水酸化ナトリウム水で洗浄し、さらに水洗して

-13-

特開昭53-133687(4)

（純度96%）を得る。

さらにアセトンで再結晶して精製系Q₁₀ 11.9g（純度98.8% m.p. 49℃）を得た。

実施例 2

ハイポラスポリマーHP-20（40メッシュ、三井化成工業株式会社製）200mlを45mmφのカラムに充填しアセトン：メタノール（2：8）混合液で満たした。次にソラネソールと2,3-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノンをとを酸化型樹脂の存在下に混合させて得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-ノナブレンニルハイドロキノ（還元型精製系Q₉）を含む油状物30g（純度46%）を前記混合液30mlに添加して攪拌乳濁させてから充填カラム中を流動させる。次いで同一混合液で洗出させる。次に2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-ノナブレンニルハイドロキノンを含む区分を減圧蒸餾して得た処理物をイソプロピルエーテル400mlに溶解させ二酸化鉛3.6gを加し4時間攪拌する。酸化鉛を分別したのち減圧蒸餾すると

-12-

芒硝で脱水後減圧蒸餾する。次いで蒸留物のアセトン可溶部を取り、アセトンを留去して得た2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンニルハイドロキノ（還元型精製系Q₁₀）を含む油状物30g（純度55%）を以下実施例1と同様に処理し精製系Q₁₀ 13.4g（純度98.7% m.p. 49℃）を得た。

実施例 4

ハイポラスポリマーHP-40（比表面積704.7m²/g、細孔容積0.687ml/g、40メッシュ、三井化成工業株式会社製）200mlをガラス製円柱（φ45mm×300mm）に投入し、アセトン：メタノール（3：7）混合液にて逆洗し、静置した。次に充填カラム上に1-デカブレンニルと2,3-ジメトキシ-5-メチル-ハイドロキノ-4-セノアセートをとを三井化ホウ素・エーテル錯体樹脂により結合することによつて製造した2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンニルハイドロキノ-4-セノアセート（還元型精製系Q₁₀のエステル）を含

-14-

9 (純度99.9% n.p. 4.9℃) を得た。

抽出物20g(純度58%)を前記混合液20mlで攪拌乳濁させてから仕込む。次いで同一混合液で抽出させる。抽出液は約100mlずつ区分し、それぞれの区分液の縮減小量についてシリカゲル層薄クロマトグラフィーを行つて2,3-ジメトキシ-5-メチル-6-デカブレンニルハイドロキノン-4-モノアセテートを含む区分を集合させ、溶媒を減圧濃縮によつて除去する。得られた抽出物20gをイソプロピルエーテル150mlに溶解し、これに10g苛性カリを含むメタノール10mlを加える0分間放電後、水30mlを加え、室温で攪拌下に30分間空気を導入して酸化する。次にイソプロピルエーテル層を水洗し、溶媒を減圧留去して得られた精留液Q₁₀含有物を再びハイパーラムポリマーHP-20を200ml充填したカラムで実施例1と同様に抽出展開し精留液Q₁₀を含む区分を集合させ、溶媒を減圧留去すると精留液Q₁₀ 6.9g(純度97%)を得る。

さらにアセトンで再結晶して精留液Q₁₀ 5.8

特許出願人 日清製粉株式会社

昭 59 10. 11 特

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 52 年特許第 45176 号(特開昭
53-133687 号 昭和 53 年 11 月 21 日
発行 公開特許公報 53-1337 号掲載)につ
いては特許法第17条の2の規定による補正があ
ったので記のとおり掲載する。 (111)

Int. Cl. ⁷ C12P 7/06	識別記号	庁内整理番号
		6760-4B

手 続 補 正 書 (自 願)

昭和59年 3 月 16 日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1 事件の表示

昭和 52 年特許第 45176 号

2 発明の名称

加群基 R の製造法
(本日付名称変更)

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 103

住所 東京都中央区日本橋小湊町19番12号

名称 日 研 製 薬 有 限 公 司

代表者 松 本 隆 夫

(本日付印紙変更)

4 補正の対象

明細書の「発明の名称」、「特許請求の範囲」
および「発明の詳細な説明」の欄

5 補正の内容

1) 本願明細書を別紙訂正明細書のとおり全文
補正する。

訂 正 明 細 書

1 発明の名称 加群基 R の製造法

2 特許請求の範囲

1) 還元型加群基 R を多孔性合成樹脂で処理し、
次いで処理した還元型加群基 R を酸化した後、
さらに多孔性合成樹脂で処理することを特徴
とする加群基 R の製造法。

2) 多孔性合成樹脂が非活性多孔性合成樹脂で
ある場合活性剤を使用してなる前記特許請
求の範囲第 1 項記載の方法。

3) 多孔性合成樹脂が活性多孔性合成樹脂であ
る場合非活性剤を使用してなる前記特許請
求の範囲第 1 項記載の方法。

3 発明の詳細な説明

本発明は還元型加群基 R を多孔性合成樹脂で
処理し、次いで処理した還元型加群基 R を酸化
してから再び多孔性合成樹脂で処理することを
特徴とする加群基 R の製造法に関する。

加群基 R は生体内では電子伝達系に関与し、
各種代謝に対して優れた薬理効果を示す物質で